

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(S1) Classification internationale des brevets ⁶ : C08G 61/12		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/22648 (43) Date de publication internationale: 26 juin 1997 (26.06.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/02003</p> <p>(22) Date de dépôt international: 13 décembre 1996 (13.12.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 95/15044 19 décembre 1995 (19.12.95) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): CIS BIO INTERNATIONAL [FR/FR]; R.N. 306, F-91400 Saclay (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): LIVACHE, Thierry [FR/FR]; 18, Les Simianes, F-38560 Haute-Jarrie (FR). ROGET, André [FR/FR]; Pavillon 12, 15, rue de la Contamine, F-38120 Saint-Egrève (FR). TEOULE, Robert [FR/FR]; 52, rue Thiers, F-38000 Grenoble (FR).</p> <p>(74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie, José etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: METHOD FOR REDUCING THE SURFACE REACTIVITY OF COPOLYMERS PRODUCED BY ELECTROCHEMICAL POLYMERISATION</p> <p>(54) Titre: PROCEDE POUR REDUIRE LA REACTIVITE DE SURFACE DE COPOLYMERES OBTENUS PAR POLYMERISATION ELECTROCHIMIQUE</p>			
<p style="text-align: center;"> $- [A]_x - [A]_y - \begin{matrix} [A] \\ \\ [B] \end{matrix} \quad (I)$ $\begin{matrix} [A] \\ \\ [B] \end{matrix} \quad (II)$ </p>			
<p>(57) Abstract</p> <p>A method for preparing a copolymer of general formula (I) by electrochemically copolymerising a compound of general formula (II) with a compound [A], wherein [A] is a monomeric unit of a polymer capable of being produced by electrochemical copolymerisation, [B] is a side group that may be a monomer or a polymer and is bound to unit [A] by a covalent bond or via a spacer arm, and x and y are integers of at least 1. Said method includes a treatment enabling the surface reactivity of said copolymer to be reduced.</p>			
<p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention est relative à un procédé de préparation d'un copolymère de formule générale (I) par copolymérisation électrochimique d'un composé de formule générale (II) avec un composé, [A] représentant une unité monomère d'un polymère susceptible d'être obtenu par copolymérisation électrochimique, [B] représentant un groupe latéral qui peut être un monomère ou un polymère, lié à l'unité [A] par liaison covalente, ou par l'intermédiaire d'un bras espacer, et x et y représentant des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1, lequel procédé comprend un traitement permettant de réduire la réactivité de surface dudit copolymère.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GR	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finnlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**PROCEDE POUR REDUIRE LA REACTIVITE DE SURFACE DE
COPOLYMERES OBTENUS PAR POLYMERISATION ELECTROCHIMIQUE.**

La présente Invention est relative au traitement de polymères synthétisés par voie électrochimique, 5 en vue de leur utilisation pour la construction de matrices adressées.

La construction de matrices de composés ayant une affinité pour des produits biologiques, par exemple des matrices de peptides, d'oligonucléotides, de récepteurs, etc... peut être réalisée de plusieurs façons. 10 Trois méthodes ont été principalement décrites : le dépôt photochimiquement dirigé [FODOR S. et al., Science, 251, 767-773, (1991)], le dépôt mécanique [KHRAPKO K.R. et al., DNA Sequencing and Mapping, 1, 375-338, (1991)] ou 15 le dépôt électrochimiquement dirigé [Demande internationale PCT publiée sous le numéro WO 94/22889 ; LIVACHE et al., Nucl. Acids. Res. 22, 15, 2615-2921 (1994)].

Les dépôts d'oligonucléotides sur les différents points du support peuvent être réalisés soit par 20 synthèse nucléotidique *in situ* [FODOR S. et al. ; Demande PCT WO 94/22889], soit par fixations successives d'oligonucléotides synthétisés préalablement [FODOR S. et al. ; KHRAPKO K.R. et al. ; Demande PCT WO 94/22889].

Dans le premier cas, l'on procède à un lavage 25 de toute la surface du support après chaque addition de nucléotide. Ce lavage sert simplement à éliminer l'excès de réactif présent sur le support ; il n'est en rien lié à la nature même du support.

Dans le second cas (fixations successives 30 d'oligonucléotides) deux types de traitement sont décrits ; certains auteurs [(SAIKI R.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 6230-6234, (1989), KRAPKO et al (déjà cité) ou LAMTURE et al., Nucl. Acids. Res., 22, 2121-2125, (1994)] procèdent à un seul lavage final du support 35 après la fixation de tous les oligonucléotides. Ce lavage à l'eau, ou dans un tampon d'hybridation permet

d'éliminer les sondes n'ayant pas réagi sur le support. Dans le même but, LIVACHE et al. rincent le support à l'eau entre chaque fixation d'oligonucléotide ; il y a donc, dans ce cas autant de rinçages qu'il y a de couplages d'oligonucléotides.

Cependant, les Inventeurs ont constaté que lorsque plusieurs dépôts de polymères obtenus de façon électrochimique sont effectués en des points différents d'une même matrice d'électrode, des contaminations sporadiques inter-electrodes peuvent avoir lieu. En effet, lors de la synthèse d'un polymère sur l'électrode numéro n en présence de l'oligonucléotide n , une contamination par l'oligonucléotide n sur l'électrode $n-1$, déjà recouverte par un oligonucléotide $n-1$ peut être observée. Il s'en suit un signal faiblement positif du spot $n-1$ lors de l'hybridation avec l'oligonucléotide n . Ce phénomène peut être illustré par les résultats de quatre hybridations croisées citées dans la publication de LIVACHE et al., Nucl. Acids. Res. 22, 15, 2615-2921 (1994). Sur les quatre dépôts, deux contaminations légères (environ 10% du signal maximum) sont visibles. Elles avaient été interprétées à l'époque comme étant des hybridations non spécifiques ; cependant, des expériences ultérieures des Inventeurs, impliquant des séquences oligonucléotidiques différentes ont montré qu'il s'agissait en fait de contaminations.

Il est important, pour une utilisation diagnostique d'une matrice d'oligonucléotides couplés à un support, que ce type de contaminations soit totalement éliminé. Or, les traitements de lavage habituellement mis en oeuvre sont insuffisants pour obtenir ce résultat.

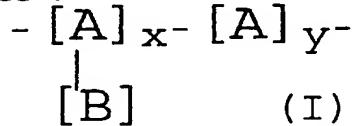
La présente Invention s'est fixé pour but le traitement spécifique de polymères obtenus de façon électrochimique, afin de diminuer, voire d'annuler, les phénomènes de contamination sporadiques.

Dans ce but les Inventeurs ont étudié le mécanisme de polymérisation électrochimique. On sait que cette polymérisation fait intervenir en particulier des réactions radicalaires [GENIES et al., J. Electroanal. Chem., 149, 101-113, (1993)], et lorsqu'un polymère $n-1$ est synthétisé, il peut éventuellement garder en surface pendant un certain temps, des espèces réactives capables de capturer des produits lors de la polymérisation sur l'électrode n .

Les Inventeurs ont émis l'hypothèse qu'en réduisant la réactivité de surface du polymère, l'on parviendrait à éliminer les contaminations observées lors de la synthèse adressée de molécules biologiques en surface dudit polymère.

La présente Invention a pour objet un procédé de synthèse d'un copolymère par copolymérisation électrochimique, caractérisé en ce qu'il comprend un traitement permettant de réduire la réactivité de surface dudit copolymère.

En particulier, la présente Invention a pour objet un procédé de préparation d'un copolymère de formule générale (I) suivante :



par copolymérisation électrochimique d'un composé de formule générale (II) suivante :



avec un composé [A],

[A] représentant une unité monomère d'un polymère susceptible d'être obtenu par copolymérisation électrochimique, [B] représentant un groupe latéral qui peut

être un monomère ou un polymère, lié à l'unité [A] par liaison covalente, ou par l'intermédiaire d'un bras espaceur, et x et y représentant des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1, lequel procédé est caractérisé en ce 5 qu'il comprend, à l'issue de ladite copolymérisation électrochimique, au moins une étape où l'on soumet le copolymère obtenu à un traitement permettant de réduire sa réactivité de surface.

Au sens de la présente Invention, on entend 10 par "réactivité de surface" la persistance, à la surface du copolymère formé, d'espèces réactives capables de fixer une unité de formule (II), et par "réduction de la réactivité de surface", on entend l'inactivation au moins partielle de ces espèces réactives, ce qui ne permet la 15 fixation que d'une quantité nulle ou faible d'unités de formule (II). Les contaminations résultant de cette fixation sont ainsi supprimées ou réduites jusqu'à ne plus être détectables, ou à ne produire qu'un signal négligeable, facilement distinguable d'un signal positif.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la 20 présente Invention, [A] représente un monomère de polymère conducteur électronique ; de préférence ledit polymère conducteur électronique est choisi parmi le polyacétylène, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phényle vinylène), le polypyrrène, le polypyrrrole, le polythiophène, le polyfurane, le polysélénophène, la 25 polypyridazine, le polycarbazole, la polyaniline, et leurs dérivés substitués (les substituants peuvent être par exemple des chaînes d'hydrocarbures saturés ou non, 30 (de préférence des chaînes en C₁₋₃), des cycles aromatiques ou non, ou des hétérocycles, etc...) ; ledit polymère conducteur électronique peut également être un copolymère de deux ou plusieurs monomères [A] différents, par exemple des monomères de pyrrole et des monomères de thiophène. 35

Avantageusement, [A] est une unité pyrrole.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente Invention, [B] représente un nucléotide, un oligonucléotide ou un de leurs dérivés ou analogues.

Dans le cadre de l'exposé de la présente Invention, on entend par exemple par dérivé ou analogue de nucléotide, des nucléotides modifiés, tels que ceux décrits par UHLMANN, [Chemical Review, 90:4, 543-584 (1990)] ; des d'analogs de nucléotides entrant dans la composition d'oligonucléotides synthétiques ; des dérivés de nucléotides portant des fonctions protégées qui sont couramment utilisés pour la synthèse des acides nucléiques.

[B] peut aussi être un composé non naturel pouvant s'hybrider avec les acides nucléiques, tels que ceux décrits par UHLMANN (publication précitée).

Les Inventeurs ont constaté que trois types de traitement pouvaient être mis en oeuvre pour réduire la réactivité des polymères :

- Un traitement chimique, à base de produits connus pour leur activité antiradicalaire ou leur activité inhibitrice de la polymérisation radicalaire ;
- Un traitement électrochimique permettant de réduire ou de suroxyder le polymère ;
- Un rinçage en présence de produits capables d'éliminer les courtes chaînes de polymère en croissance adsorbées sur le support.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente Invention, le traitement mis en oeuvre pour réduire la réactivité de surface du copolymère comprend au moins :

- un traitement chimique antiradicalaire ; ou bien
- un traitement électrochimique permettant de modifier le degré d'oxydation dudit polymère ; ou bien
- un traitement comportant au moins un rinçage en présence d'un agent tensio-actif, ou bien une combi-

naison d'au moins deux parmi les trois traitements ci-dessus.

Un traitement chimique conforme à l'Invention peut être mis en oeuvre de façon simple en procédant à un 5 rinçage du polymère par une solution contenant un produit antiradicalaire.

Avantageusement, les antioxydants tels que les dérivés du tocophérol (famille de la vitamine E) sont utilisés. Il est également avantageux d'utiliser des inhibiteurs ou des retardants de polymérisation radiculaire, tels que par exemple le nitrobenzène ou les benzoquinones, qui sont des retardants classiques de la polymérisation du styrène [ODIAN G., Principles of polymerization, JOHN WILEY & Sons, Interscience Publication, 10 15 (1981)]. Ces produits, dissous dans un solvant adéquat (par exemple l'eau, l'acetonitrile, l'éthanol, ou un mélange de ces solvants), se sont en effet avérés également actifs vis-à-vis de la réactivité des polymères fabriqués de façon électrochimique (polypyrrole par exemple).

Le traitement électrochimique peut être mis en oeuvre en réduisant ou en oxydant le polymère conducteur de façon contrôlée, par exemple dans un système électrochimique à 3 électrodes. On choisira, pour la mise en oeuvre de ce traitement, une gamme de potentiel dans 20 25 laquelle [B] est stable (par exemple de -1 à +1V/ECS pour les acides nucléiques).

Le rinçage en présence d'agents tensioactifs permet d'éliminer les chaînes courtes de polymère conducteur encore réactives. De préférence, chaque rinçage par 30 35 une solution contenant un agent tensioactif doit être suivie d'un ou plusieurs rinçages visant à éliminer les traces de tensioactif. Lorsque l'on travaille sur des polymères chargés (comme par exemple du polypyrrole sous sa forme oxydée), on choisira de préférence des agents tensioactifs non-ioniques qui seront plus faciles à éliminer.

Le procédé conforme à la présente Invention est plus particulièrement destiné à être mis en oeuvre lors de la synthèse d'un ensemble de copolymères de formule générale (I) dont deux au moins comprennent un groupe latéral [B] différent, sur un même support dont la surface est constituée d'électrodes disposées en matrice, les copolymères comprenant un groupe latéral [B] différent étant portés par des électrodes différentes. Dans ce cadre, les copolymères de formule générale (I) sont synthétisés l'un après l'autre, chacun sur son électrode-support respective, en mettant en oeuvre un procédé conforme à l'Invention, tel que défini ci-dessus. En d'autres termes, après la synthèse de chaque copolymère, est effectué un traitement ayant pour but de réduire sa réactivité de surface, et permettant d'éviter sa contamination par des réactifs utilisés dans la synthèse du polymère suivant.

La mise en oeuvre d'une méthode de traitement conforme à l'Invention permet ainsi, contrairement aux rinçages à l'eau ou avec un tampon, d'éliminer les contaminations inter-électrodes, et d'obtenir une matrice de plots parfaitement individualisés. Les traitements conformes à l'Invention sont faciles à mettre en oeuvre et peuvent être automatisés.

Dans tous les cas, le support de polymère conducteur portant la molécule d'intérêt biologique est fabriqué par exemple selon le procédé décrit dans le Brevet WO 94/22889. Seuls les traitements réalisés après la synthèse de chaque dépôt diffèrent.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé conforme à l'Invention.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de

l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : MISE EN OEUVRE DE METHODES DE DE-
CONTAMINATION CONFORMES A L'INVENTION LORS DE LA PREPARA-
TION DE MATRICES DE POLYPYRROLE PAR COPOLYMERISATION**

1) Synthèse des oligonucléotides

Le support de synthèse consiste en une plaque de silicium portant 48 électrodes d'or indépendantes et isolées les unes des autres. Chaque électrode est un carré dont la dimension du côté est soit 25, 50, 100 ou 200 µm.

On procède à la synthèse localisée, sur chaque électrode, d'un polymère de polypyrrole sur lequel est greffé, de façon covalente, un oligonucléotide, par copolymérisation de noyaux de pyrrole oxydé, dont certains portent ledit oligonucléotide.

La polymérisation est conduite, selon le procédé décrit dans la demande PCT WO 94/22889 dans une solution contenant $2 \cdot 10^{-2}$ M de pyrrole, $6 \cdot 10^{-8}$ M de pyrrole substitué (oligonucléotide porteur d'un groupe pyrrole noté pyr par la suite) et 0,1 M de LiClO₄.

Les oligonucléotides portant le pyrrole en 5' (oligonucléotides G-pyr, T1-pyr, T2-pyr) ont été synthétisés selon la méthode décrite dans la demande PCT WO 94/22889, et purifiés par HPLC sur phase inverse.

Séquence des oligonucléotides utilisés

Oligo G-pyr 5'Pyrrole-CTCCAAGAAAGGACCC 3'

Oligo T1-pyr 5'Pyrrole-CTCCAGGCATTGAGC 3'

Oligo T2-pyr 5'Pyrrole-CAACCCAACGCTACT 3'

Le modèle de matrice qui a été utilisé pour étudier les contaminations est constitué par une plaquette de 5 électrodes portant chacune un dépôt différent, à savoir, dans l'ordre des synthèses :

- Electrode 1 : un dépôt de polypyrrole pur
35 (témoin négatif) ;

- Electrode 2 : un dépôt d'un copolymère de polypyrrole et de l'oligonucléotide G-pyr,

- Electrode 3 : un dépôt d'un copolymère de polypyrrole et de l'oligonucléotide T1-pyr,

5 - Electrode 4 : un dépôt d'un copolymère de polypyrrole et de l'oligonucléotide T2-pyr ;

- Electrode 5 : un dépôt de polypyrrole pur.

Après le branchement de l'électrode sur laquelle va être opéré le dépôt, la plaquette est introduite dans la cellule réactionnelle en présence d'une contre électrode de platine et d'une électrode de référence au calomel (ECS) et de 600 µl de milieu réactionnel comprenant éventuellement les oligonucléotides-pyrrole désirés. Les réactions d'oxydation du monomère et de réduction du polymère sont assurées par une variation cyclique du potentiel entre - 0,35 et + 0,85 V/ECS.

L'intégration du courant par rapport au temps (quantité d'électrons consommée) permet une évaluation de la masse de polymère formé sur la surface de l'électrode et donc de l'épaisseur du film. Cela assure une bonne reproductibilité des synthèses.

Après chaque synthèse, la cellule et la plaquette sont rincées selon les différentes procédures décrites ci-dessous, puis l'électrode précédemment utilisée est déconnectée, et l'électrode suivante est connectée. La plaquette est alors plongée dans un milieu réactionnel comprenant un autre couple oligonucléotide-pyrrole.

Après le dernier lavage spécifique, la plaquette est déconnectée puis rincée à l'eau distillée.

30 2) Hybridation et détection des oligonucléotides

Le contrôle de la spécificité des dépôts est réalisé par hybridation de sondes complémentaires aux oligonucléotides fixés sur le support.

Hybridation :

Les réactions d'hybridation sont conduites successivement à 40°C durant 15 mn, dans un volume final de 10 µl d'un tampon phosphate 20mM pH 7,4, NaCl 300mM, 5 EDTA 2mM, SDS 0,5%, en présence de 0,06 pmole d'oligonucléotide biotinylé en 5', respectivement complémentaire à la séquence G, T1 ou T2.

Détection :

Après l'hybridation, la plaquette est lavée à 10 température ambiante dans le tampon d'hybridation dilué 4 fois. Après un rinçage dans du PBS-NaCl 0,4 M, Tween 20 à 0,5%, la plaquette est incubée 15 mn à température ambiante dans ce même tampon en présence de 2,5 µg/ml de conjugué streptavidine-phycoérythrine. Un ultime rinçage 15 au PBS-NaCl-Tween est réalisé puis la plaquette est montée sur une lame de microscope puis recouverte par une lamelle.

La matrice est alors observée par microscopie à fluorescence, et l'intensité de fluorescence de chaque 20 point est évaluée.

3) Influence du traitement sur la spécificité de la localisation du signal fluorescent.**Généralités :**

Tous les lavages sont réalisés sur la plaquette et la cellule, à température ambiante et après 25 chaque synthèse de polymère (sauf mention contraire), selon l'un des protocoles suivants :

1) rinçage à l'eau (identique à celui décrit dans la demande PCT WO 94/22889)

30 2) rinçage long à l'eau : cinq rinçages à l'eau successifs

3) traitement électrochimique 1 : Suroxydation du dépôt à 1,2 V/ECS pendant 1 mn puis rinçage à l'eau

35 4) traitement chimique : «mélange S» est un solvant comportant 68% d'acétonitrile, 16% d'éthanol et 16% d'eau) ; «mélange S+vite» est une dilution d'une

solution alcoolique à 50 mM d'alpha-tocophérol à 1 mM dans le solvant « S » ; le traitement est suivi d'un rinçage à l'eau ; la cuve est simplement rincée à l'eau

5) rinçage en présence d'un détergent anionique : rinçage à l'eau, puis dans une solution de dodecylsulfate de sodium (SDS) à 0,5%, suivi d'un autre rinçage à l'eau.

6) rinçage en présence d'un détergent non-ionique : rinçage à l'eau puis dans une solution de Tween 10 20 à 0,3%, suivi d'un autre rinçage à l'eau.

b) Résultats :

Chaque matrice obtenue est hybridée successivement avec les trois sondes biotinylées complémentaires des oligonucléotides G, T1 et T2. L'hybridation est détectée par détermination de l'intensité de fluorescence, comme indiqué ci-dessous.

Les résultats sont reportés dans les tableaux 1A à 1F ci-dessous, qui reproduisent respectivement les résultats des expérimentations 1 à 6.

20 Dans ces tableaux, chaque colonne correspond à l'une des électrodes 1 à 5 ; chaque ligne correspond à l'une des sondes complémentaires respectivement de G, T1 et T2. L'intensité de fluorescence de chaque point est notée de 0 à +++, ou V(*,*) si le résultat est variable 25 et non reproductible entre les deux limites précisées entre parenthèses.

TABLEAU 1A

	1	2	3	4	5
compl. G	V(0,+)	+++	0	0	0
compl. T1	0	V(0,++)	+++	0	0
compl. T2	0	0	V(0,+)	+++	0

TABLEAU 1B

	1	2	3	4	5
compl. G	V(0, +)	+++	0	0	0
compl. T1	0	V(0, ++)	+++	0	0
compl. T2	0	0	V(0, +)	+++	0

TABLEAU 1C

	1	2	3	4	5
compl. G	0	+	0	0	0
compl. T1	0	0	++	0	0
compl. T2	0	0	0	+	0

TABLEAU 1D

	1	2	3	4	5
compl. G	0	+++	0	0	C
compl. T1	0	0	+++	0	C
compl. T2	0	0	0	+++	C

TABLEAU 1E

	1	2	3	4	5
compl. G	0	++	0	0	C
compl. T1	0	0	++	0	C
compl. T2	0	0	0	+	C

TABLEAU 1F

	1	2	3	4	5
compl. G	0	+++	0	0	0
compl. T1	0	0	+++	0	C
compl. T2o	0	0	0	+++	0

25 Ces résultats montrent que 3 types de traitement sont plus efficaces que le traitement initial (n° 1) pour diminuer les réactions non spécifiques dues aux contaminations :

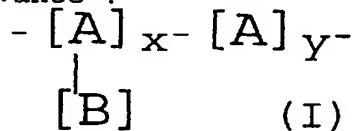
- Le traitement impliquant une suroxydation (traitement n° 3)

- Le rinçage en présence d'un produit antiradicalaire : la vitamine E (traitement n° 4)
- Les rinçages en présence de tensioactifs (traitement n° 5 et 6).

REVENDICATIONS

1) Procédé de synthèse d'un copolymère par copolymérisation électrochimique, caractérisé en ce qu'il comprend un traitement permettant de réduire la réactivité de surface dudit copolymère.

2) Procédé de préparation d'un copolymère de formule générale (I) suivante :



10 par copolymérisation électrochimique d'un composé de formule générale (II) suivante :



15 avec un composé, [A]

[A] représentant une unité monomère d'un polymère susceptible d'être obtenu par copolymérisation électrochimique, [B] représentant un groupe latéral qui peut être un monomère ou un polymère, lié à l'unité [A] par liaison covalente, ou par l'intermédiaire d'un bras espacer, et x et y représentant des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend, à l'issue de ladite copolymérisation électrochimique, au moins une étape où l'on soumet le copolymère obtenu à un traitement permettant de réduire sa réactivité de surface.

30 3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que [A] représente un monomère de polymère conducteur électronique.

35 4) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le traitement mis en œuvre pour réduire la réactivité de surface du copolymère comprend au moins :

- un traitement chimique antiradicalaire ; ou bien

- un traitement électrochimique permettant de modifier le degré d'oxydation dudit polymère ; ou bien

5 - un traitement comportant au moins un rinçage en présence d'un agent tensio-actif, ou bien une combinaison d'au moins deux parmi les trois traitements ci-dessus.

10 5) Procédé selon une quelconque des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que [A] est choisi parmi le polyacétylène, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phénylène vinylène), le polypyrrène, le polypyrrole, le polythiophène, le polyfuranne, le polysélénophène, la polypyridazine, le polycarbazole, et la polyaniline, et les dérivés substitués de ces polymères etc...

15 6) Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que [A] est une unité pyrrole.

7) Procédé selon une quelconque des revendications 2 à 6 caractérisé en ce que [B] représente un nucléotide, un oligonucléotide ou un de leurs dérivés ou analogues.

20 25 8) Procédé de synthèse d'un ensemble de copolymères de formule générale (I) dont deux au moins comprennent un groupe latéral [B] différent, sur un même support dont la surface est constituée d'électrodes disposées en matrice, les copolymères comprenant un groupe latéral [B] différent étant portés par des électrodes différentes, et étant synthétisés l'un après l'autre, chacun sur son électrode-support respective, en mettant 30 en œuvre un procédé selon une quelconque des revendications 1 à 7.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/02003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C08G61/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C08G G01N C12Q C07H C08J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 29199 A (BIO MERIEUX ;GARNIER FRANCIS (FR)) 2 November 1995 -----	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search 26 February 1997	Date of mailing of the international search report 29.04.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer Stienon, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 96/02003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9529199 A	02-11-95	FR 2720832 A CA 2165978 A EP 0705291 A	08-12-95 02-11-95 10-04-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der Internationale No
PCT/FR 96/02003

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C08G61/12

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C08G G01N C12Q C07H C08J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 29199 A (BIO MERIEUX ;GARNIER FRANCIS (FR)) 2 Novembre 1995 -----	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou être pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 26 Février 1997	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 29.04.97
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+ 31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Stienon, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à membres de familles de brevets

Date Internationale No
PCT/FR 96/02003

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9529199 A	02-11-95	FR 2720832 A CA 2165978 A EP 0705291 A	08-12-95 02-11-95 10-04-96